

DG2018-36  
LC-MSによる  
核酸医薬品の定量

*Quantitative analysis of oligonucleotide  
therapeutics by LC-MS*

---





# Members

新井 浩司  
*Koji Arai*

(LSIメディエンス)

石川 千裕  
*Chihiro Ishikawa*

(大日本住友製薬)

大崎 史雄  
*Fumio Osaki*

(アステラス製薬)

鎌倉 健雄  
*Takeo kamakura*

(塩野義製薬)

戸嶋 麻美  
*Asami Toshima*

(協和発酵キリン)

林 善治  
*Yoshiharu Hayashi*

(シミックファーマサイエンス)

安原 秀典  
*Hidenori Yasuhara*

(田辺三菱製薬)

横井 宏之  
*Hiroyuki Yokoi*

(大塚製薬)

若松 明  
*Akira Wakamatsu*

(グラクオ・スミスクライン)



# 活動の経緯 *Activities*

## ◆ May 2018

- ✓ メンバー募集 Members application

## ◆ 26 Jun 2018

- ✓ キックオフ会議 Kick off Face to Face meeting

## ◆ Jul 2018~Dec 2018

- ✓ TC と メールを用いた議論 TC and discussion used by E-mail
- ✓ アンケート (Oct 2018) Survey

## ◆ Jan 2017~Feb 2017

- ✓ ポスター準備 Posters preparation

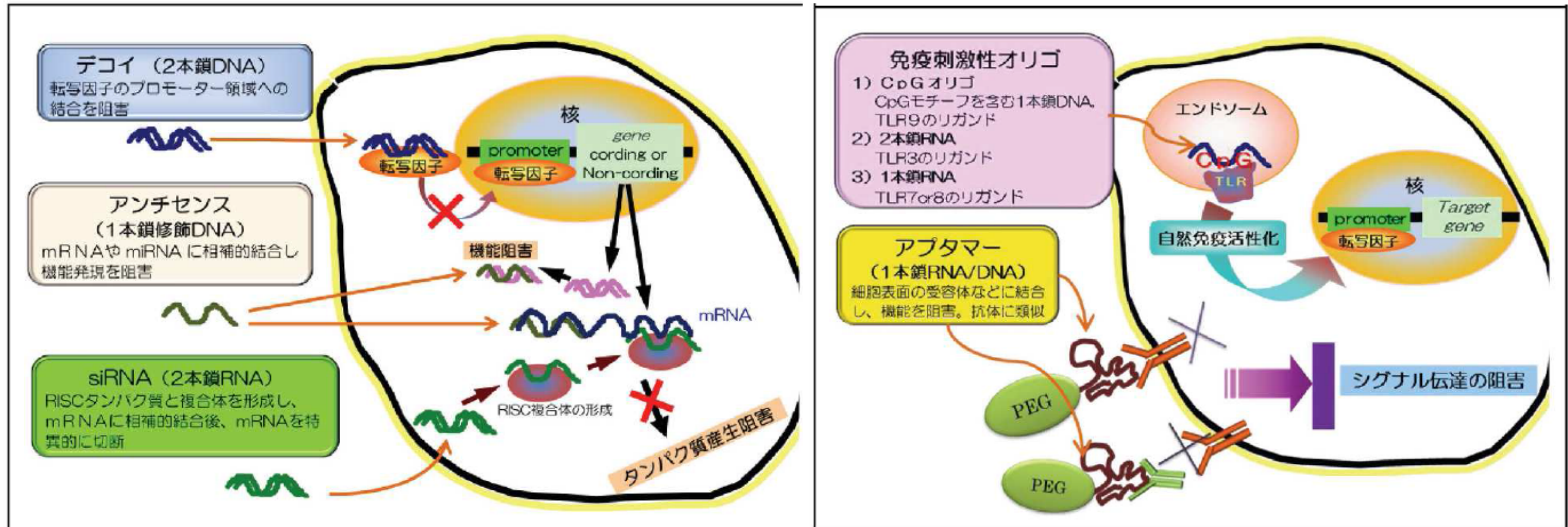
## 本DGにおける核酸医薬品の定義

**核酸あるいは修飾型核酸が直鎖状に結合したオリゴ核酸を薬効本体とし、タンパク質発現を介さず直接生体に作用するもので、化学合成により製造される医薬品**

出典：

井上 貴雄：核酸医薬品の開発動向，先端治療技術の実用化と開発戦略（核酸医薬，免疫療法，遺伝子治療，細胞医薬品），第1章，第1節，3-18（2017）

# 核酸医薬品の分類 *Classification*



## 核酸医薬品の種類

(左：細胞内で作用するもの，右：受容体等に作用するもの)

出典：南海 浩一，核酸医薬品用オリゴヌクレオチドの製造，生産と技術 第67巻 第2号 (2015)

## 核酸医薬品 各種分析法 Overview

分類	Pros	Cons
LC-MS(/MS)	LCガイドラインに準拠可 代謝物との分離が可能	前処理が煩雑 感度不足
HPLC-UV	LCガイドラインに準拠可 代謝物との分離が可能	感度不足
Hybridization-LC-fluorescence	高感度 代謝物との分離が可能 前処理が簡便	報告例少ない やや高コスト
LBA	LBAガイドラインに準拠可 スループットが高い 高感度	前処理が煩雑 定量法確立に時間必要 代謝物との分離が困難
qPCR	高感度 前処理が簡便	日間差があり再現性が悪い 代謝物との分離が困難
電気泳動	条件検討が不要で、簡便	工程数が多く、スループットが悪い 感度不足 代謝物との分離が困難
ラベル化 (蛍光 or RI)	前処理等がなく、最も簡便	RIは合成に時間・コストがかかる 蛍光色素修飾は化合物の物性が変わる可能性がある



# 既存の医薬品との比較

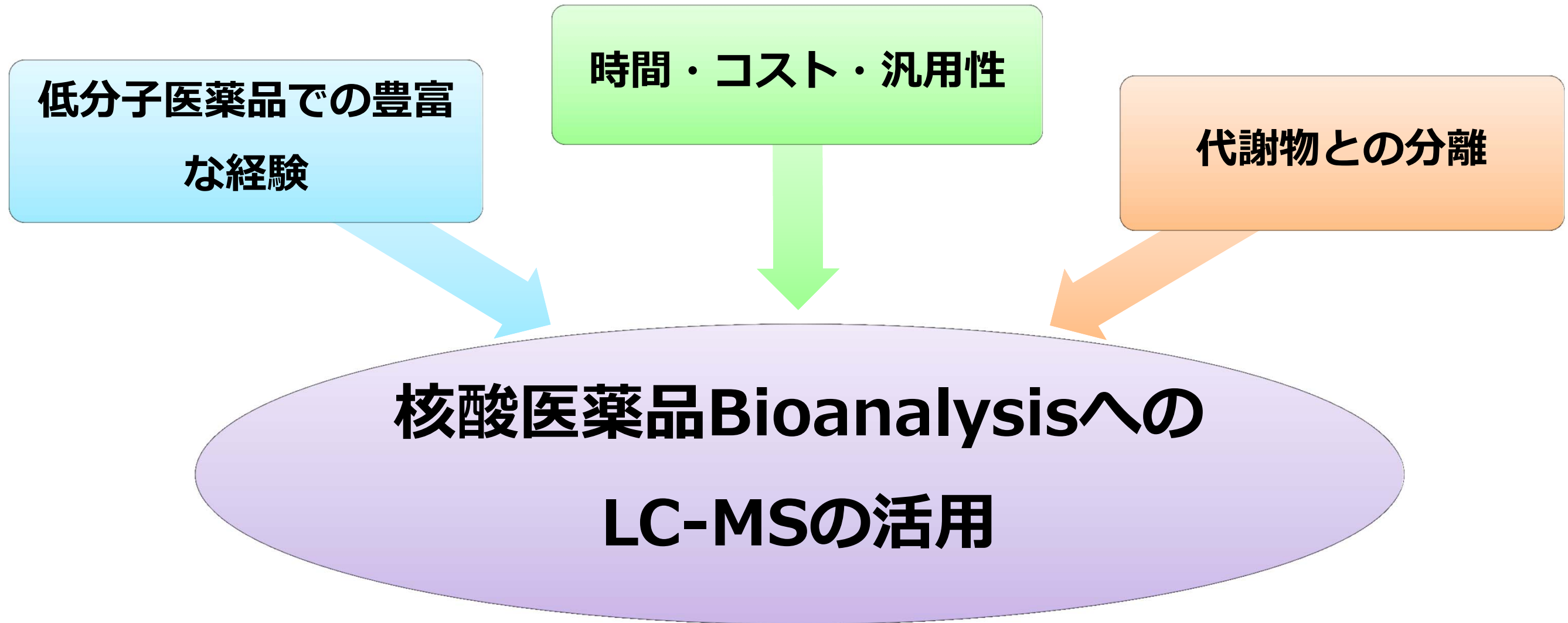
	化学合成医薬品	核酸医薬品	バイオ医薬品
分子量	通常 < 1kDa	通常 ≤ 10kDa	通常 ≥ 30kDa
生産方法	化学合成	化学合成	バイオテクノロジー技術
種特異性	非特異的	時に種特異的	種特異的
主な定量分析法	<ul style="list-style-type: none"> <li>主にクロマトグラフィー法 (LC-MS, HPLC, GC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>クロマトグラフィー法 (LC-MS/MS, HPLC, GC)</li> <li>リガンド (LBA) 結合法 (ハイブリダイゼーション + ELISA, SPR, ECL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>主にリガンド (LBA) 結合法 (ELISA, SPR, ECL)</li> </ul>

出典：ICH S6 対応研究班，核酸医薬品の非臨床安全性を考える，医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，PMDRS，46(5)，286～289（2015）  
 本間 尚子：核酸医薬品の承認審査における薬物動態評価，第40回薬物動態談話会講演資料（2018）

**核酸医薬品は中分子としての位置づけ**  
 低分子医薬品とバイオ医薬品の特徴を併せ持つ

**核酸医薬品のBioanalysis**  
 クロマトグラフィー法とLBA法のどちらも適用可能

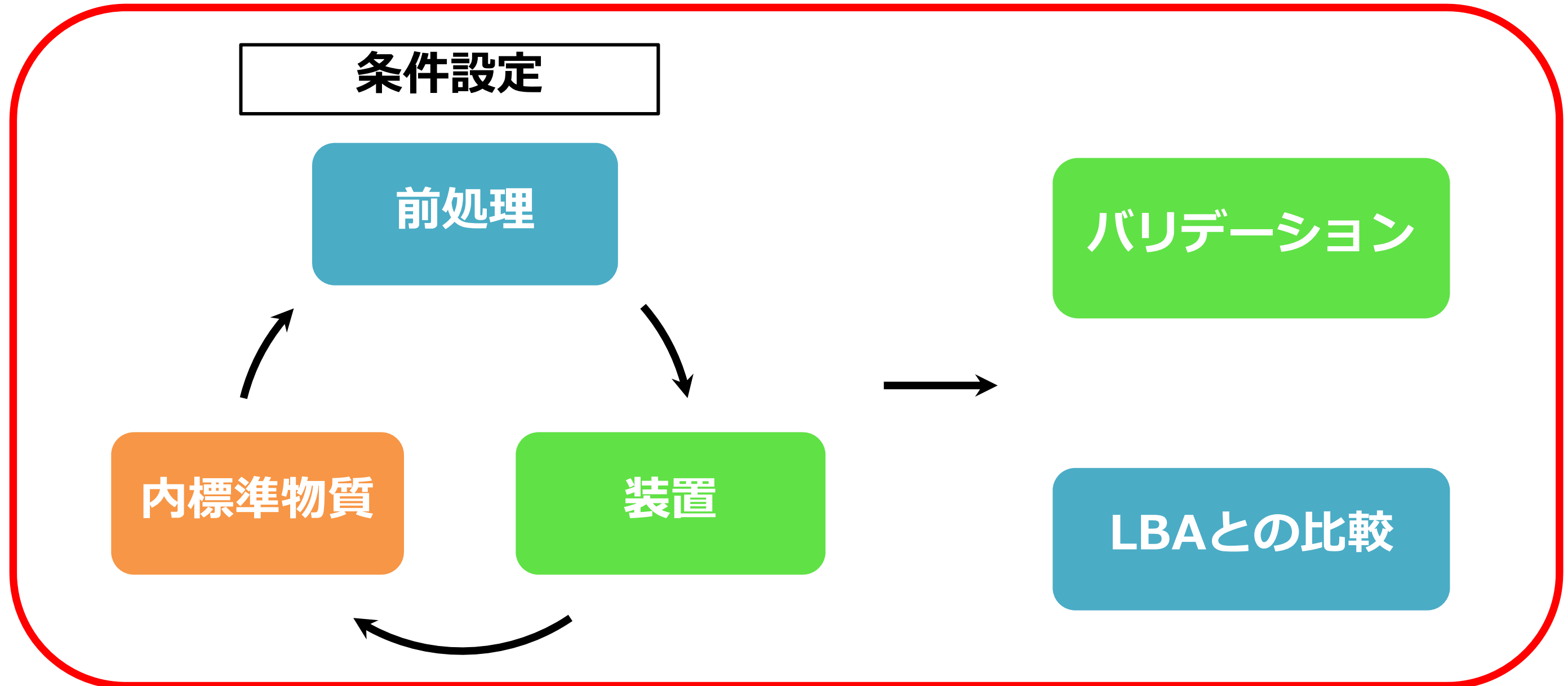
# LC-MSを用いた核酸医薬品の定量



<http://bioanalysisforum.jp/>

現状の課題と対策について議論





## 今回の議論のテーマ

(LC-MSを用いた核酸医薬品定量の全体像を把握する)



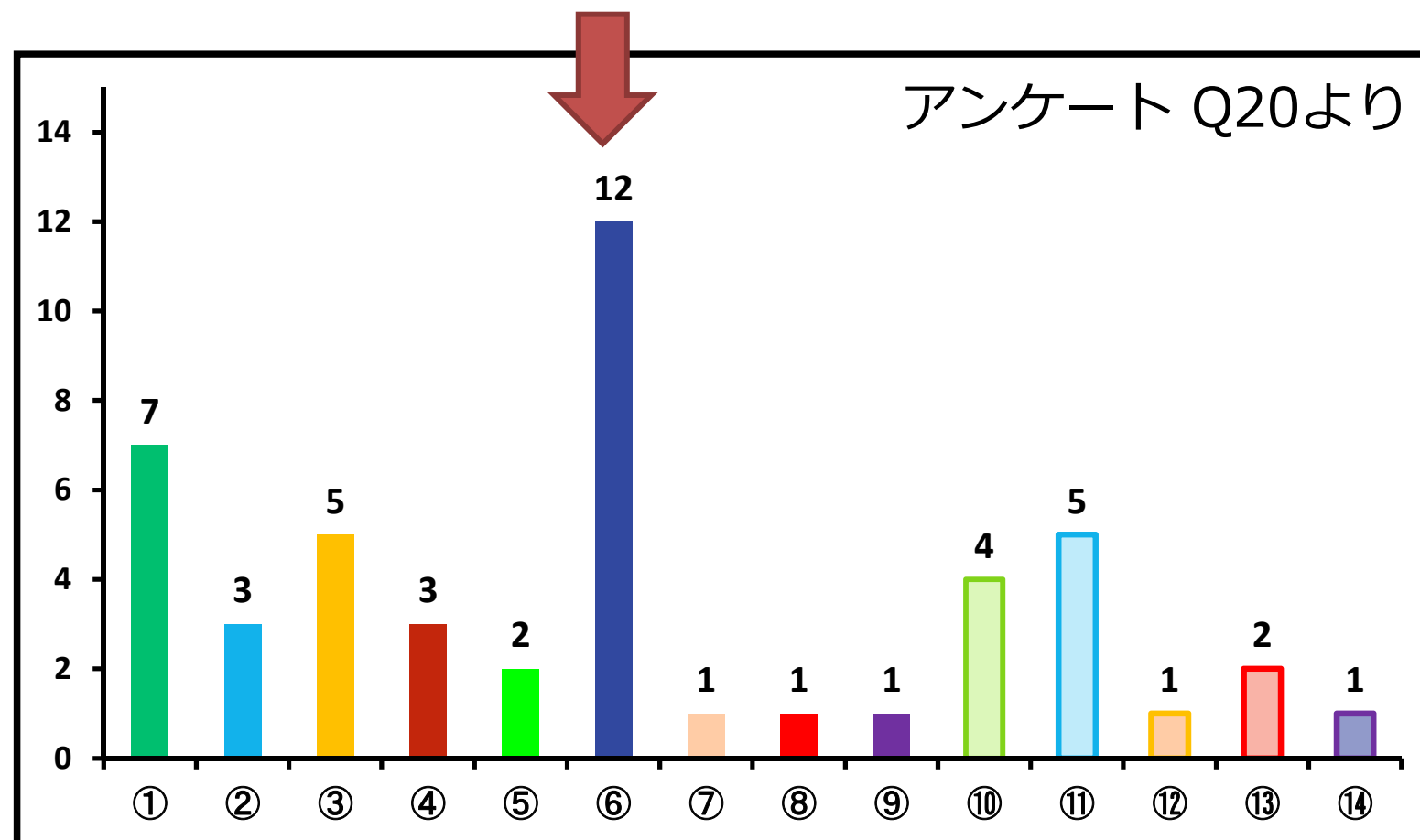
# 前処理

---

(Sample preparation)

# 生体試料の前処理 Sample Preparation

- LC-MS 分析に際して、血漿、組織ホモジネート、尿等のマトリックスから測定対象の核酸医薬品を抽出する必要がある。
- 核酸医薬品は化学修飾、リガンド付加等により天然の核酸と物性が大きく異なるため、化合物毎の最適化が必要である。



測定法構築時の課題（上位3つ）は？

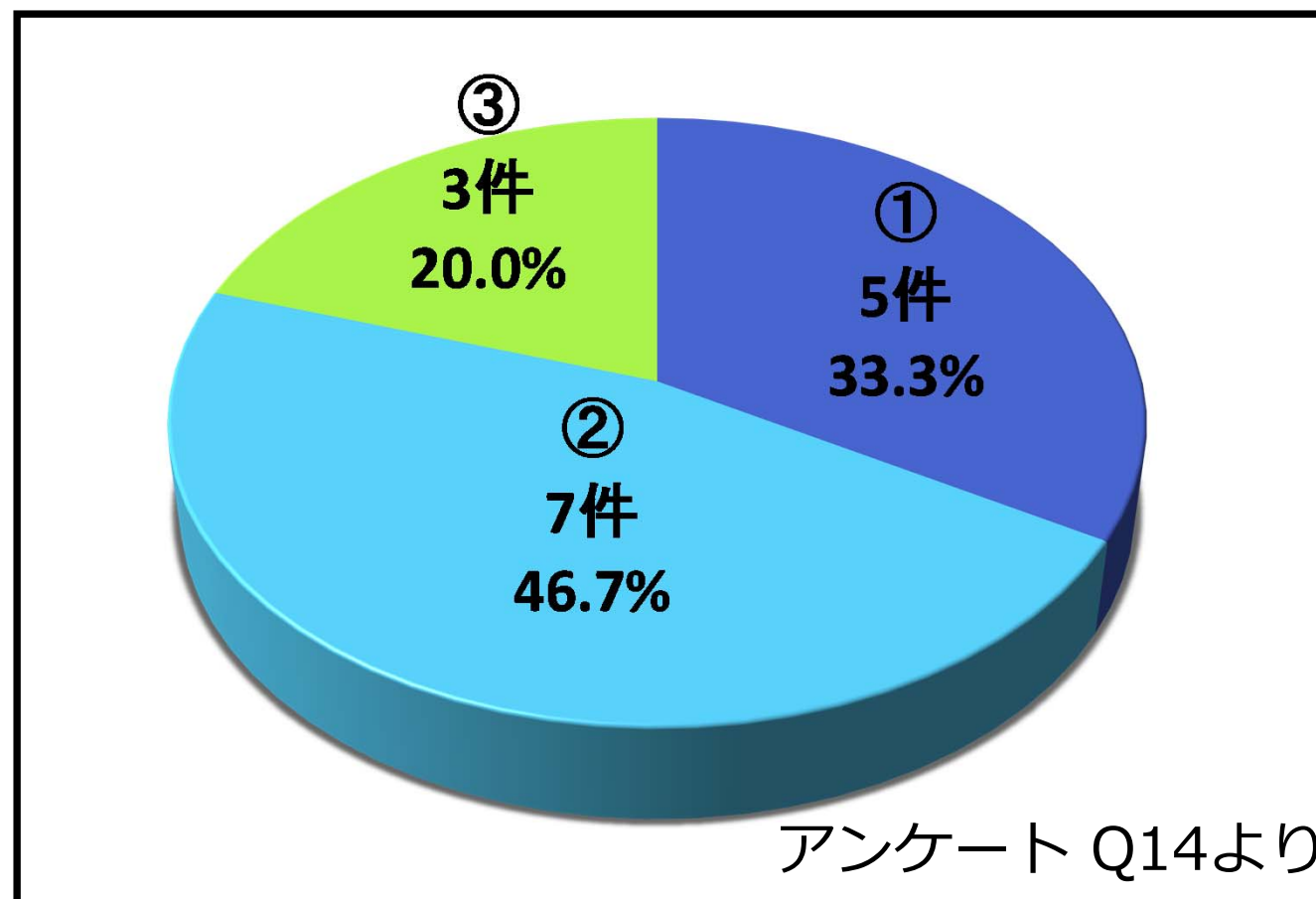
- ① 容器への吸着
- ② キャリーオーバー（インジェクター回り）
- ③ キャリーオーバー（配管、カラム）
- ④ 内標準物質の選択、⑤安定性
- ⑥ **前処理法の検討**、⑦検量線レンジ
- ⑧ 検量線が直線になりにくい（2次曲線）
- ⑨ カラムの選択
- ⑩ 定量に使用するイオン（m/z）の設定
- ⑪ 定量下限、⑫機器のメンテナンス
- ⑬ 金属アダクトイオンの影響
- ⑭ その他

前処理方法の最適化が測定法構築の成功の鍵



# 代表的な前処理方法 Typical Methods

- 液液抽出：フェノール・クロロホルム抽出
- 固相抽出：Oasis HLB, Oasis WAX, Clarity OTX 等
- 液液抽出 + 固相抽出
- その他：市販 RNA 抽出キット, 相補鎖プローブ等



最初に検討する前処理方法は？

- ① 液液抽出
- ② 固相抽出
- ③ 市販のDNA/RNA抽出キット
- ④ その他

固相抽出法が主流

- 核酸抽出の最も古典的な手法。
- フェノールでタンパクを不溶化。遠心分離後，中間層にタンパク質が凝集することを利用し，上層の核酸を回収する。

## 代表的なプロトコル

生体試料



フェノール・クロロホルム添加



※攪拌，遠心分離後に上層（水相）を採取



（クロロホルム添加、※を繰り返す）



（共沈剤添加、エタノール沈殿）



LC-MS

事前にProteinase K 処理することで回収率や前処理中の安定性が改善。変性剤や界面活性剤添加するケースも。

 **Tips**

化合物により最適なpHが異なる

攪拌条件（時間，強さ，温度）がクリティカルに影響

フェノール除去、脱塩を目的に実施するケースあり

- 複数の分離モードから化合物に最適なものを選択.
- 96wellタイプを用いたハイスループット化や自動化が可能.

### 代表的なプロトコル

固相カートリッジ/プレート  
洗浄 & 平衡化

Oasis HLB(イオンペア試薬),  
Oasis WAX, Clarity OTX 等

 **Tips**

↓  
サンプルロード

事前にProteinase K 処理することで  
回収率や前処理中の安定性が改善.  
(マトリックスに大きく依存)  
変性剤や界面活性剤添加するケースも.

↓  
洗浄

↓  
溶出

濃縮が必要な場合に実施.  
完全乾固しない方がよい場合も.  
分解や再溶解液の組成に注意.  
フィルターろ過するケースも.

↓  
(乾固, 再溶解)

↓

LC-MS



# 液液抽出 + 固相抽出 LLE + SPE

- 液液抽出と固相抽出を組み合わせる手法.
- どちらか一方のみでは精製が不十分な場合：
  - ✓ 分析カラムが劣化し, 安定的に連続分析できない
  - ✓ 再現性が悪い
  - ✓ 固相抽出時に詰まる (繊維質の組織等)  
→ 2ステップの丁寧な前処理で解決する可能性
- スループット性に大きな課題.
- SPE(Clarify OTX)では1ステップ抽出が可能なケースも.

# その他 前処理方法 Other Preparations

## □ 市販核酸抽出キット

化学修飾核酸には適用できないケースが多い

## □ 有機溶媒や酸による除タンパク

回収率が低く、一般的には用いられない

## □ 相補鎖プローブを用いた Hybridization 法

1本鎖核酸で報告例あり      Bioanalysis (2017) 9(23), 1859–1872

## □ 強陰イオン交換磁気ビーズ

揮発性の塩で溶出することで脱塩不要      Rapid Commun Mass Spectrom. 2011 Nov 15;25(21):3207-15.

## □ イオン交換クロマトグラフィーでの分取

代謝物解析等の定性分析で報告例あり

### 前処理に起因したトラブルの事例

- 低回収率
- 再現性不良
- 前処理中に分解
- 分析カラムの劣化
- MS汚染による感度低下
- SPE基材のロット差

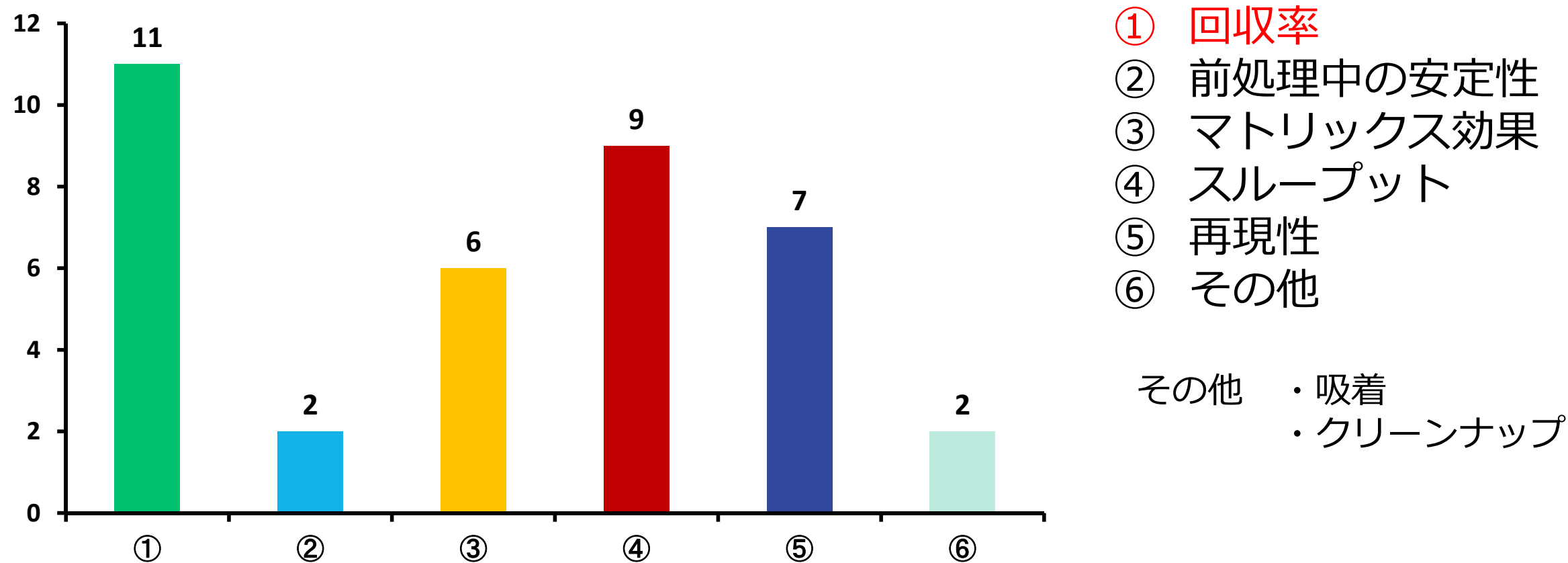
### 回収率に影響する因子

- タンパク結合
- 化学修飾やリガンド付加による物性変化
- 吸着
- 前処理中の安定性



# 前処理の課題 Problems in sample Preparation

Q15 生体試料中の核酸医薬品をLC-MSで定量する際の  
前処理法の課題を教えてください



**回収率が大きな課題** → 改善できれば高感度化に繋がる

DG 内の意見

Aさん

再現性や感度に問題なければ回収率は検討しない。

感度不足の際に、原因特定の一環として前処理の各ステップで回収率を算出するケースがある。

Bさん

後々のトラブルを考慮し、回収率5割を目標に検討。

Cさん

各社で対応は様々。  
回収率の算出自体が難しいとの意見も。

# 各前処理の回収率例(1)

希釈のみ	LLE
タンパク沈殿	LLE + SPE
酵素消化	SPE
酵素消化 + LLE	

Methods	Type of OGN	Matrices	Recovery
Simple dilution	PS ODNs	Mouse plasma	94%
Simple dilution	PS ODNs	Mouse urine	87-97%
PP with SDS solution and ammonium acetate - OGN precipitation with ethanol	PS ODNs		16%
Enzyme digestion with multicomponent digestion reagent	siRNAs duplexes	Cell culture and formulated media	>95%
Enzyme digestion - LLE with phenol/chloroform (1:1)	PS ODNs	Mouse brain, heart, kidney, muscle	50-85%
Enzyme digestion - LLE with phenol/chloroform (1:1)	PS ODNs	Mouse liver, lung, spleen and tumor	12-75%
Enzyme digestion - LLE with phenol/cresol reagent	PS ODNs	Mouse plasma and tissues (liver, kidney, spleen, heart, lung, brain and bone marrow)	98 ± 3%
Enzyme digestion - LLE with phenol/chloroform /water reagent	PS ODNs	Plasma and urine	~80%
LLE with phenol/chloroform (1:1)	PS ODNs	<i>In vitro</i> incubation of oligonucleotides with human liver microsomes	95%
LLE with phenol/chloroform (2:1, v/v) with ammonium hydroxide, DTT and DNP	PS and LNA ODNs	Mouse plasma	89 ± 2%
LLE with phenol/chloroform (2:1, v/v) with ammonium hydroxide, DTT and DNP	PS and LNA ODNs	Mouse liver and kidney homogenate	92 ± 5%
LLE with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)	Unmodified and PS siRNA duplexes	Vitreous humor	14-40%
LLE with phenol/chloroform (2:1, v/v) with ammonium hydroxide - OGN precipitation	PS ODNs	Plasma samples	75.39-80.43%

http://bioanalysisforum.jp/

PS:phosphorothioate, ODN:oligodeoxynucleotide, LNA:locked nucleic acid

Journal of Chromatography B 1090 (2018) 90-100



# 各前処理の回収率例(2)

希釈のみ	LLE
タンパク沈殿	LLE + SPE
酵素消化	SPE
酵素消化 + LLE	

Methods	Type of OGN	Matrices	Recovery
LLE with phenol/dichloromethane (1:1, v/w) – SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Rat plasma	70.2-79.4%
LLE with phenol/chloroform (2:1, v/w) – SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Rat plasma	72.4-85.6%
LLE with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) – SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Human plasma	68-78%
SPE with Oasis HLB	PS ODNs		21-25%
SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Monkey plasma	22.8 ± 6.5%
SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Rat and human plasma	30-64%
SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Human plasma	65.2-73.8%
SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Rat plasma	48%
SPE with Oasis HLB	PS ODNs	Mice plasma	60.8%
SPE with Clarity OTX	PS ODNs	Plasma	97%
SPE with Clarity OTX	MOE RNA gapmer	Plasma	76%
SPE with Clarity OTX	PS OGNs	Rat plasma	>70%
SPE with Clarity OTX	2'-O-methyl, 2'-fluoro siRNA OGNs	Rat plasma	90.1%
SPE with Oasis WAX	Unmodified ODNs	Human plasma	57.9-67.6%

http://bioanalysisforum.jp/

PS:phosphorothioate, ODN:oligodeoxynucleotide, LNA:locked nucleic acid

# 各前処理の回収率例(3)

希釈のみ	LLE
タンパク沈殿	LLE + SPE
酵素消化	SPE
酵素消化 + LLE	

Methods	Type of OGN	Matrices	Recovery
SPE with phenyl-bonded column	PS OGNs with MOE modifications	Monkeys plasma, urine and tissues	~80%
SPE with phenyl-bonded column	OGNs with MOE modifications	Monkeys plasma, urine and tissues	<10%
SPE with Varian C18OH	PS OGNs	Mouse plasma	~80%
SPE with C2-emore disk extraction plate	2'-O-methyl RNA OGNs	Rat plasma	79%
SPE with DEAE anion-exchange extraction plate	2'-O-methyl RNA OGNs	Rat plasma	55%
SPE with strong anion exchange column – SPE with reversed phase column – SPE with desalting membranes	PS ODNs	Human plasma	~40%

PS:phosphorothioate, ODN:oligodeoxynucleotide, LNA:locked nucleic acid

Journal of Chromatography B 1090 (2018) 90-100

核酸フォーマットやマトリックスによって回収率は様々であり、現状、汎用的な手法は存在しない。

対象とする核酸によって、最適な前処理法を模索する必要がある。

<http://bioanalysisforum.jp/>



# 装置

---

(Instrument)



吸着・キャリア  
オーバー対策

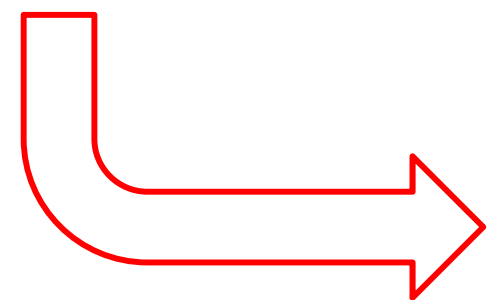
機器使用上の  
注意点

LC-MSの感度

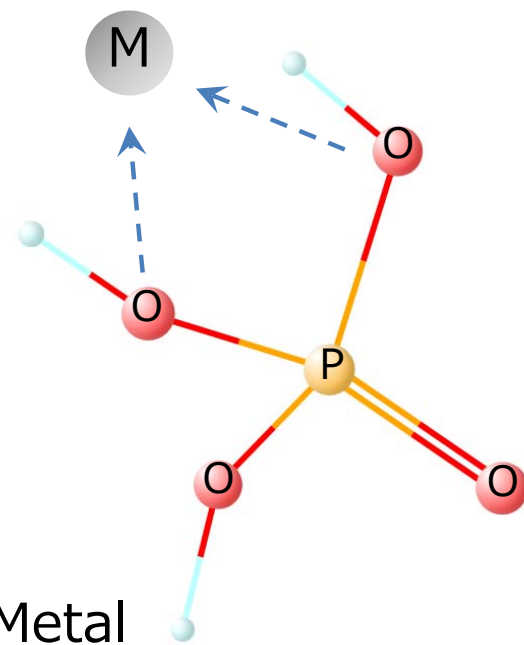
内標準物質の  
選択

# 吸着・キャリアオーバー対策

- ✓ 同じ向きに非共有電子対を持つ原子が2個以上存在すると金属表面に吸着する可能性が高くなる
- ✓ リン酸基は金属配位性吸着を示す典型的官能基



**核酸医薬品は金属に吸着しやすい傾向**



M: Metal

# 吸着・キャリアオーバー対策

吸着が抑制された素材の使用

コーティング（キレーション）

競合的に吸着を抑制

注入時の対応

## 吸着抑制効果のある素材の使用

LC（分析カラム含む）の接液部材質のメタルフリー化

PEEKインサートカラム, ガラスインサートカラム  
PEEKインサートの配管やフューズドシリカチューブ

ガードカラム（PP製）の使用

ガードカラム（PP製）の使用（頑健性には注意）

低吸着仕様のプレート, バイアル, チップの使用



## コーティング（キレーション）

測定前にリン酸を通液

移動相にキレート剤を添加

キレート剤が感度低下などを引き起こす可能性あり

ニードル洗浄液にキレート剤を添加

ニードル洗浄液にブランクマトリックスを添加

# 吸着・キャリアオーバー対策

## 競合的に吸着を抑制

### 注入試料への添加剤の工夫

- ・リン酸塩
- ・キレート剤
- ・高濃度IS
- ・他の核酸医薬品, オリゴヌクレオチド

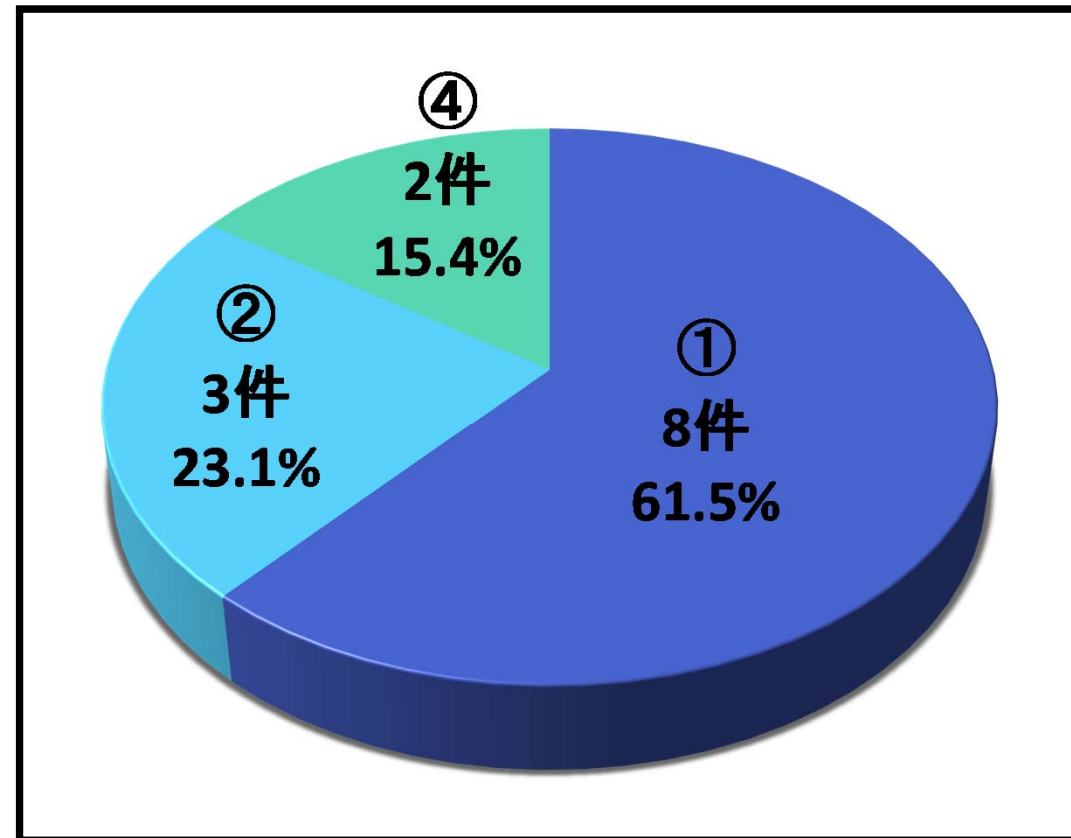
## 注入時の対応

### 注入順序の工夫

洗浄用にブランクサンプルを注入

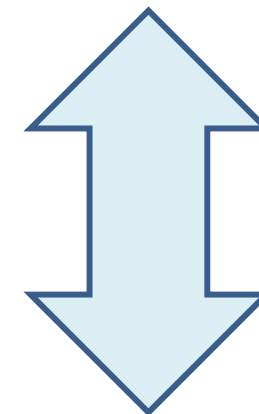
# 機器使用上の注意点

アンケート Q13より



- ① アミン系イオンペア試薬+  
フッ素系アルコールを用いた逆相系
- ② アミン系イオンペア試薬を用いた逆相系
- ③ HILIC系
- ④ イオンペア試薬を用いない逆相系
- ⑤ その他

✓ イオンペア試薬を用いた例が多い



✓ 次測定（他化合物）へ影響が懸念される

## 機器の専有化

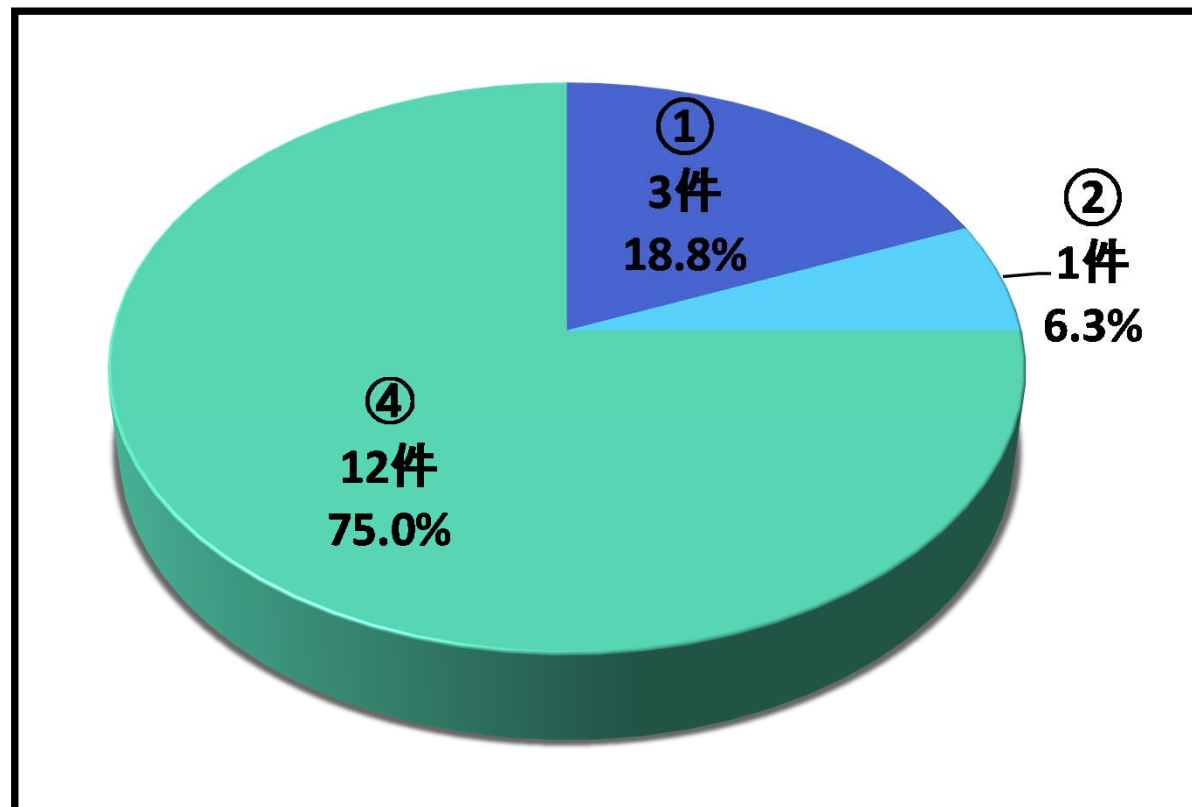


イオンペア試薬フリーの核酸医薬品測定方法が構築できれば、  
コストダウンとトラブルリスクの低減を同時に達成可能



# 機器の専有化

アンケート Q19より

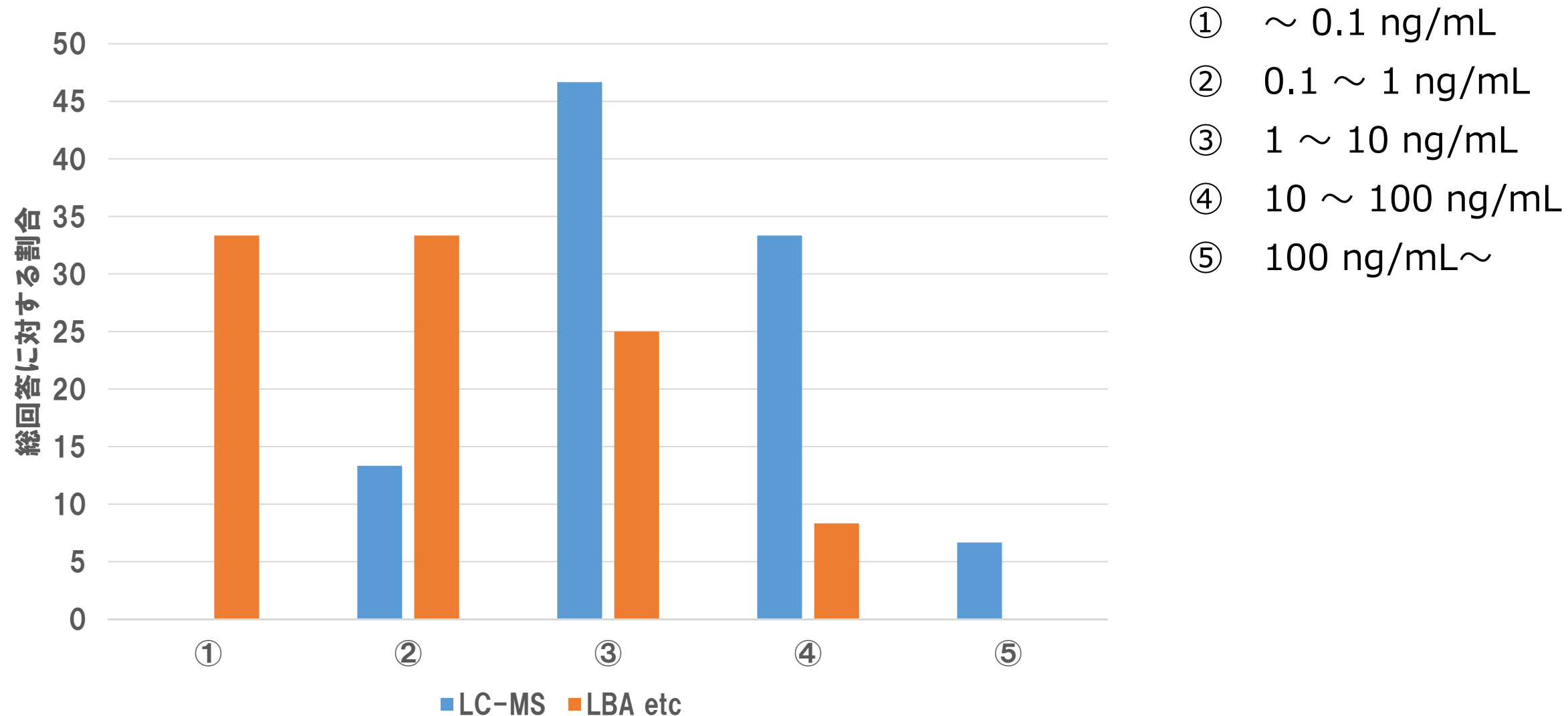


- ① LC及びMSを専有化している
- ② LCのみ専有化している
- ③ MSのみ専有化している
- ④ 専有化はしていない

- ✓ 専有化している割合は少ない
- ✓ 専有化する場合はLC及びMSを専有化しているケースが多い

# LC-MSの感度 (LBAとの比較)

アンケートQ7とQ25より作成

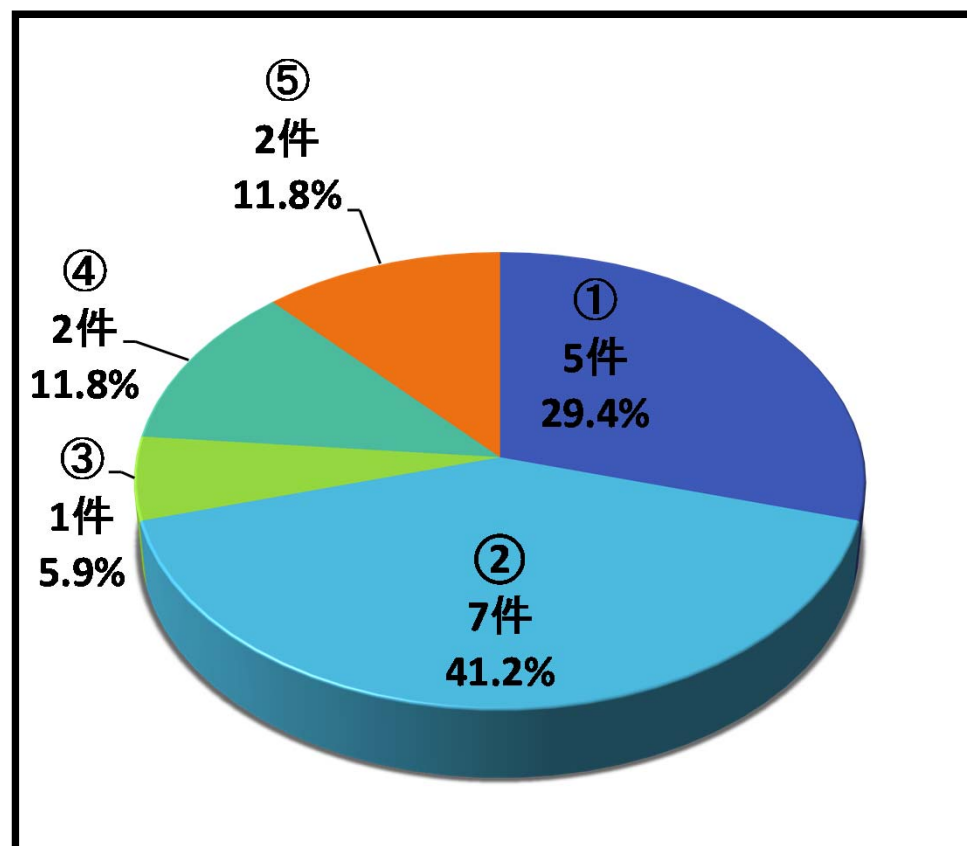


- ① ~ 0.1 ng/mL
- ② 0.1 ~ 1 ng/mL
- ③ 1 ~ 10 ng/mL
- ④ 10 ~ 100 ng/mL
- ⑤ 100 ng/mL~

- ✓ LC-MSと比較すると、感度不足は否めない。
- ✓ LBAでは確認できない代謝物（配列違いの核酸やリガンド修飾核酸のリガンドが外れたものなど）を確認できるのがMSの強みである。

# LC-MSの改善点

## 核酸医薬品定量にLC-MSを使うときに改善されると良い点



アンケート Q31より



**MSの感度が一番の課題**

- ① 前処理が簡便化されれば
- ② **MSの感度がもっと向上すれば**
- ③ 吸着が起こらない素材が入手できるようになれば
- ④ 未変化体と代謝物の分離定量のニーズがもっと高まれば
- ⑤ 核酸医薬品にフォーカスしたガイドラインが作成されれば
- ⑥ その他

# LC-MSの高感度化対策

LC関連

イオン化効率向上関連

前処理関連

MS関連



# LC-MSの高感度化対策

## LC関連

カラム温度を上昇させてピークをシャープにする

核酸に適したポアサイズの充填剤を用いる

吸着が起きない配管にする

- ステンレス配管は吸着しやすい
- PEEK, PEEKSIL, セラミックのシステムを推奨

# LC-MSの高感度化対策

## イオン化効率向上関連

ナノフロー, マイクロフローでイオン化効率向上

ポストカラムで有機溶媒を添加してイオン化効率向上

## 前処理関連

前処理での濃縮

リン酸基のマスクにより吸着回避

ビオチン化相補鎖によるアフィニティー濃縮

回収率はそれほど高くない

# LC-MSの高感度化対策

## MS関連

### 複数トランジションのピーク合算

- 四重極型では難しい
- 選択性が下がる可能性あり

### 高分解能MSでのS/N比の向上





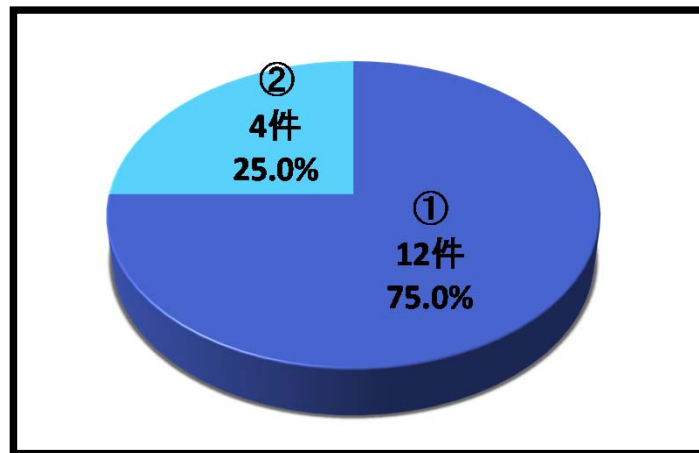
# 内標準物質

---

(Internal standard)

# 内標準物質の必要性・選択肢

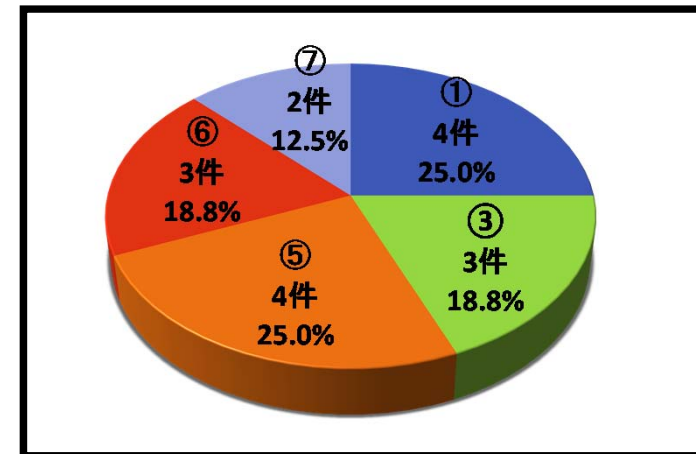
内標準物質の必要性（アンケート結果）



- ① 必須
- ② ケースバイケース
- ③ 必須ではない

アンケート Q21より

内標準物質の選択肢（アンケート結果）



- ① 安定同位体標識体
- ② スクランブル配列体
- ③ PolyTのような核酸塩基のポリマー
- ④ 開発候補品を伸長したもの
- ⑤ 開発候補品の一部の配列を変更したもの（塩基数は同じ）
- ⑥ 保持時間が類似する低分子化合物
- ⑦ その他

アンケート Q22より

内標準物質は必要であるとの共通認識だが、  
選択肢については各社意見が分かれる。

# 内標準物質のメリット・デメリット

## 内標準物質を用いるメリット

- 前処理・イオン化のばらつきを補正できる。
- 吸着防止剤としての役割を果たすこともある。

## 内標準物質を用いるデメリット

- 内標準物質の選択次第では、回収率や保持時間の違いによって、逆に再現性が悪くなることもある。
- コスト面がネックになることがある。

# 内標準物質の選択肢

選択肢	特徴安定同位体 標識体	類縁体 (塩基の延長, 配列 の入れ替え)	構造類似性は問わない (長鎖PolyTなど)
保持時間	ほぼ一致	ずれやすい	ずれやすい
合成難度	コスト面がネック SIを複数箇所に入れ る必要あり	合成しやすい	最も合成しやすい
回収率	測定物質とほぼ同じ	ある程度同じ挙動	異なる
クロストーク	発生する可能性あり	発生しにくい	発生しにくい



# バリデーション

---

(Validation)





## LC-MSによる核酸測定

- バリデーション試験は必須
  - ✓ (申請までの適用を考えた場合)
  
- BMVガイドラインのバリデーション評価項目を満たすためDiscussion
  - ✓ 核酸医薬品の特徴
  - ✓ 注意点

## 予備検討時に確認した方が良い項目など①

分類	意見まとめ										
バリデーション項目	<input type="checkbox"/> 基本はLCガイドラインに従う。										
標準物質	<input type="checkbox"/> 標準物質の純度が低分子よりも低い。										
対象マトリックス <div data-bbox="207 1024 934 1234" style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <input type="checkbox"/> 血漿血清が多い  <input type="checkbox"/> 組織の経験もそれなり  <small>(アンケートQ6より)</small> </div> <div data-bbox="192 1266 934 1680" style="margin-top: 10px;"> <table border="1" style="display: none;"> <caption>対象マトリックスのアンケート結果</caption> <thead> <tr> <th>マトリックス</th> <th>回数</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>血漿血清</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>組織</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>尿</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>その他</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> </div>	マトリックス	回数	血漿血清	15	組織	8	尿	1	その他	0	<input type="checkbox"/> 基本は血漿。 <div style="text-align: center; margin: 10px 0;">             ↓ メンバーの意見として         </div> <div style="border: 2px solid red; padding: 10px; margin-top: 10px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>● PK/PDや毒性発現に関わる場合、組織中濃度測定 のバリデーションも必要？</li> <li>● 標的臓器 (肝臓, 腎臓, 脳, 神経組織及び筋肉) の 定量も視野。</li> <li>● 血漿と核酸分解酵素の存在割合の異なる組織ホモ ジネート等での検討。</li> <li>● 髄腔内投与の場合CSF中も測定？               <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 血漿とCSF両方測定。</li> <li>➢ CSFとのKp評価の実績あり。</li> </ul> </li> </ul> </div>
マトリックス	回数										
血漿血清	15										
組織	8										
尿	1										
その他	0										

## 予備検討時に確認した方がよい項目など②

分類	意見まとめ
選択性 代謝物の扱い	<p>□ 予測される主要代謝物からの流れ込みの確認.</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>○ 容易に予測される末端塩基欠損体等は予め合成する.</p> <p>□ 低分子と同様のアプローチで, <i>in vivo</i>等でmajorな代謝物を検索する.</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>○ 必要に応じて同時定量を検討する</p>
安定性	<p>□ 安定性に影響を与えそうなものは確認しておく.</p> <div style="border: 1px solid red; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 全血から血漿への調製過程.</li> <li>● 抗凝固剤</li> <li>● 組織溶解バッファーなど</li> </ul> </div> <div style="border: 1px solid blue; padding: 10px; margin-top: 10px;"> <p>(参考) 3'-エキソヌクレアーゼに関しては, げっ歯類・ヒトの血漿中において安定性に種差がないことが報告されている<sup>1)</sup></p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">1) ANTISENSE RESEARCH AND DEVELOPMENT 1:141-151 (1991)</p>

## 予備検討時に確認した方が良い項目など③

分類	意見まとめ
テクニカル面	<p data-bbox="893 569 2709 835">□ インタクト及び活性体に関連して、測定対象と投与されたものが異なる場合の考え方は？ (2本鎖siRNAの場合など (測定対象は1本鎖となる))</p> <div data-bbox="1086 852 2585 1272" style="border: 1px solid red; background-color: #ffffcc; padding: 10px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="1145 884 2258 1052">➤ 抗体医薬品と同様 (タンパクをペプチドで測定)</li> <li data-bbox="1145 1066 2540 1234">➤ 標準物質を合成、検量線を作成し測定 (活性代謝物と同じアプローチ)</li> </ul> </div> <p data-bbox="893 1314 2576 1388">□ インタクトな二本鎖状態での濃度確認方法は？</p> <div data-bbox="1086 1451 2585 1776" style="border: 1px solid red; background-color: #ffffcc; padding: 10px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="1115 1482 2407 1556">➤ 二本鎖状態でのMS検出は現状困難.</li> <li data-bbox="1115 1570 2525 1738">➤ 二本鎖の標品を入手しアンチセンス鎖とセンス鎖を分別定量することは可能.</li> </ul> </div> <div data-bbox="1169 1829 2763 2039" style="border: 1px solid black; background-color: #ffe6e6; padding: 10px; margin-top: 10px;"> <p data-bbox="1199 1860 2644 2007">✓ 濃度が一致したとしても、2本鎖状態の確認ができたかの判断には注意が必要.</p> </div>

## 予備検討時に確認した方が良い項目など④

分類	意見まとめ
その他	<p>□核酸医薬品のLC-MS測定の評価基準は？ (抗体医薬品のLC-MS測定には，LBA-GLを適応)</p> <div style="border: 2px solid red; border-radius: 15px; padding: 10px; margin: 10px 0;"> <p>➤ EBFの見解<sup>2)</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 高分子：LBA-GL推奨 [20%基準] (特にimmunoaffinityによる前処理の場合)</li> <li>➤ ペプチドやオリゴヌクレオチド ： LC-GL推奨 [15%基準]</li> </ul> <p style="text-align: right; font-size: small;">2) Bioanalysis. 2013;5(18):2211-4</p> </div> <p>□スペクトルパターンの確認</p> <div style="border: 2px solid red; border-radius: 15px; padding: 10px; margin: 10px 0;"> <p>➤ 生体マトリックスの種類や，前処理前後によってスペクトルパターンが変化しないかを確認。 ◎特に四重極の装置で測定時は注意する。</p> </div>

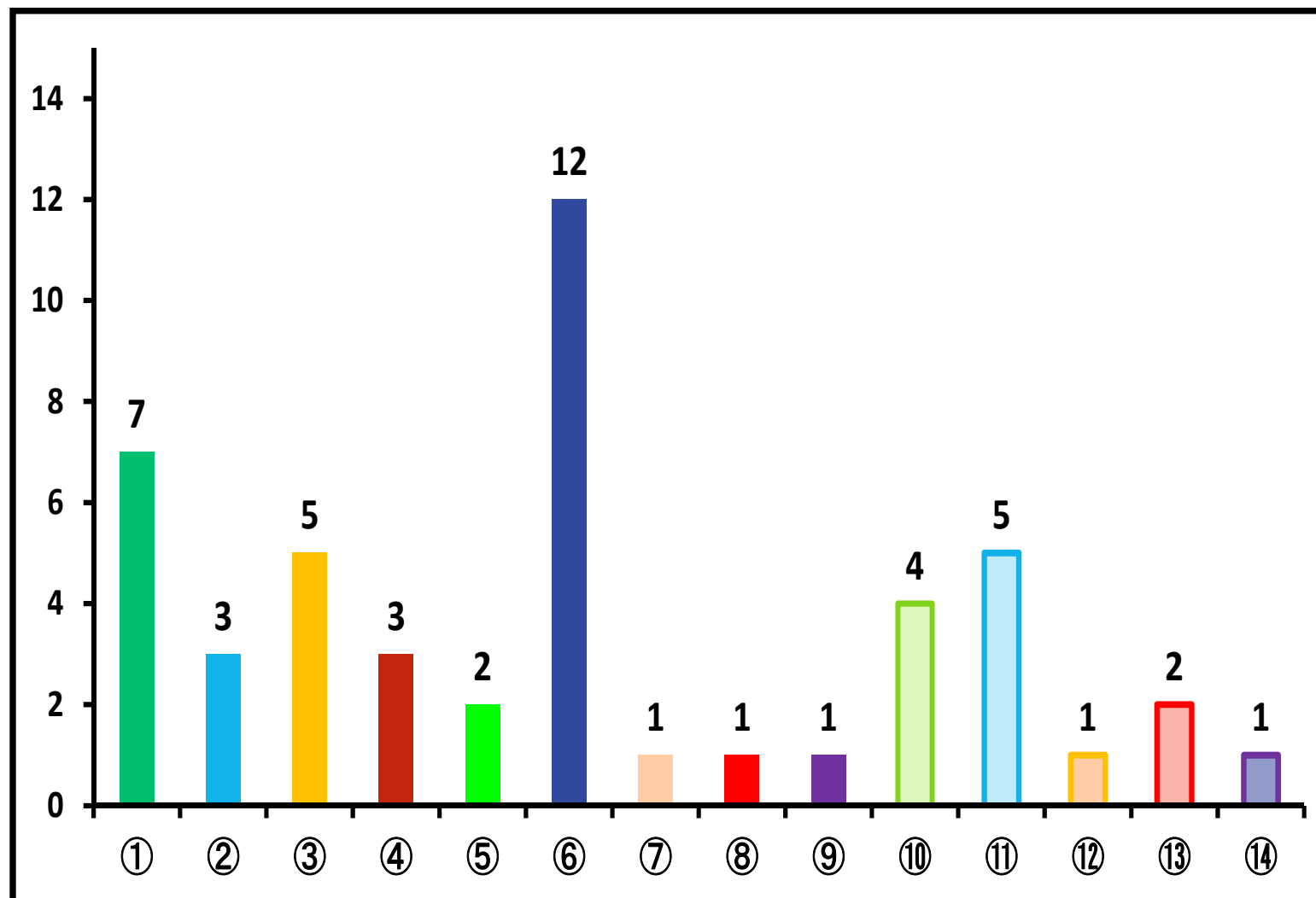


## 測定法構築時の課題

アンケート Q20より

- ✓ 簡便なジェネリックメソッドがないこと
- ✓ 吸着／キャリアオーバーの回避方法

大きな課題



- ① 容器への吸着
- ② キャリーオーバー（インジェクター回り）
- ③ キャリーオーバー（配管，カラム）
- ④ 内標準物質の選択、⑤安定性
- ⑥ 前処理法の検討、⑦検量線レンジ
- ⑧ 検量線が直線になりにくい（2次曲線）
- ⑨ カラムの選択
- ⑩ 定量に使用するイオン（m/z）の設定
- ⑪ 定量下限、⑫機器のメンテナンス
- ⑬ 金属アダクトイオンの影響
- ⑭ その他

その他の意見

・LC条件

# 検量線；メンバー議論

Q1; 検量線は直線？曲線？



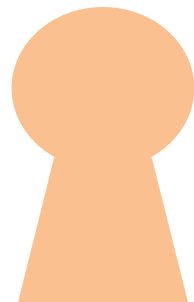
- 基本はできる限り直線が望ましい。
  - 直線にならないならその理由を追求すべき？
  - バリデーション項目が適合すれば、曲線でも可？

Q2; 二次曲線（Quadratic）で実施する上での懸念点は？

- 二次曲線のバッチ間での傾きが揃わない？
- 吸着が原因の場合、施設間での差が懸念点。
- 分析面での不備を指摘される？
- 曲線にするための科学的な説明が可能？



Q3; アンカリングポイントの設定は？



- バリデーションの基本項目（検量線、日内再現性）が取得できれば問題ないのでは。

# 検量線 ; メンバー議論及びまとめ

Q4;直線で引けない場合の対応



- 直線で引ける範囲に限定.
- 低濃度はLBA法.
- バリデーション項目を満たせば曲線も可.
- 検量線を2本作成 (低濃度, 高濃度) .

DGからの推奨は . . .

- 第一選択は直線.
- バリデーション項目を満たせば, 曲線でも科学的根拠は不要.
- やむを得ない場合, 直線の範囲内で作成したり, 直線を2本作成する.

## 測定対象についてメンバー議論①

Q;測定対象はインタクトのみか？  
活性体も測定するのか？

理想はインタクトと  
活性体両方測定.

安全性評価の中のTK濃度測定では、  
インタクトの濃度測定で最低限ク  
リアできる.

活性体が正確に評価  
可能なら測定対象.

AUCベースでMIST対象  
なら両方必須.

活性代謝物は、in vivoで  
ある程度生成する場合は測  
定対象にする.

代謝活性体がどのような活性（意味）  
を持つか次第で測定対象.

## 測定対象についてメンバー議論②

Q; 1~2塩基脱離体の扱いは？



- 血漿中に添加した時点で、1-2塩基脱離体が分解物として生成された経験あり。
- 代謝で生成する可能性があるなら代謝物。
- 末端塩基脱離体はオンターゲットでも、オフターゲットの懸念が増大。
- 核酸特有の課題として、暴露量が高い場合評価が必須  
(暴露の基準を低分子と同じとしていいかは不明)

A; 結局のところ測定対象は？

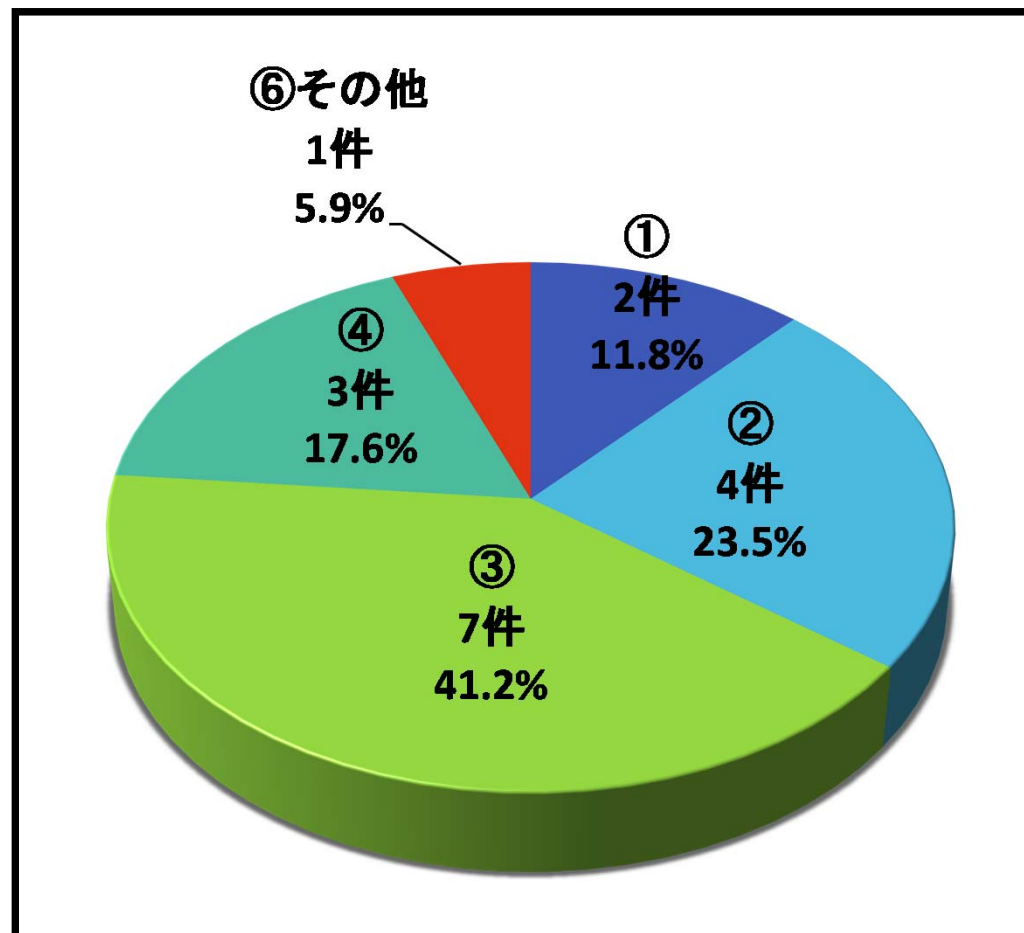
➤ 測定対象は薬効や毒性説明に必要と考えるものを選択。



# 核酸医薬品の代謝物定量

アンケート Q28より

## ✓ 明確なガイドラインのない現状ではケースバイケース



- ① 低分子医薬品と同じレベル（ICH M3）での定量評価が必要
- ② 新しい基準（ガイドライン）を作成し、その基準に従った定量評価が必要
- ③ 代謝物の定量評価は必要だと考えるが、対象は開発品ごとに変える
- ④ キャリアを結合させた核酸医薬品ではキャリア脱離体の定量は必要と考えるが、それ以外の代謝物については不要
- ⑤ 生成される可能性のある代謝物とその毒性は*in silico*や*in vitro*でカバーできるため定量評価は不要
- ⑥ その他

その他の意見 ・ わからない

# 既承認核酸医薬品の測定方法について

現状

LBA法が主流  
(Hyb-ELISA, ECL etc.)

2018

Patisiranの測定方法 (2018年US承認)  
非臨床試験 : LC-MS/MS  
臨床試験 : ATTO-Probe-HPLC

将来

LC-MS/MS, HPLC測定が増加する可能性？



# 既承認の核酸医薬品情報

一般名	商品名	分類	マトリックス	測定法
Nusinersen Sodium	SPINRAZA <sup>®</sup>	アンチセンス	CSF 血漿など	LBA法 (Hyb-ELISA Hyb-ECL)
Mipomersen Sodium	KYNAMRO <sup>®</sup>	アンチセンス	血漿 尿	LBA法 (Hyb-ELISA) キャピラリー電 気泳動
Pegaptanib Sodium	MACUGEN <sup>®</sup>	アプタマー	血漿	LBA法 (Dual Hyb- ELISA)
Patisiran	ONPATTRO <sup>™</sup>	siRNA	血漿	(非臨床) LC-MS/MS (臨床) ATTO-Probe- HPLC

<http://bioanalysisforum.jp/>



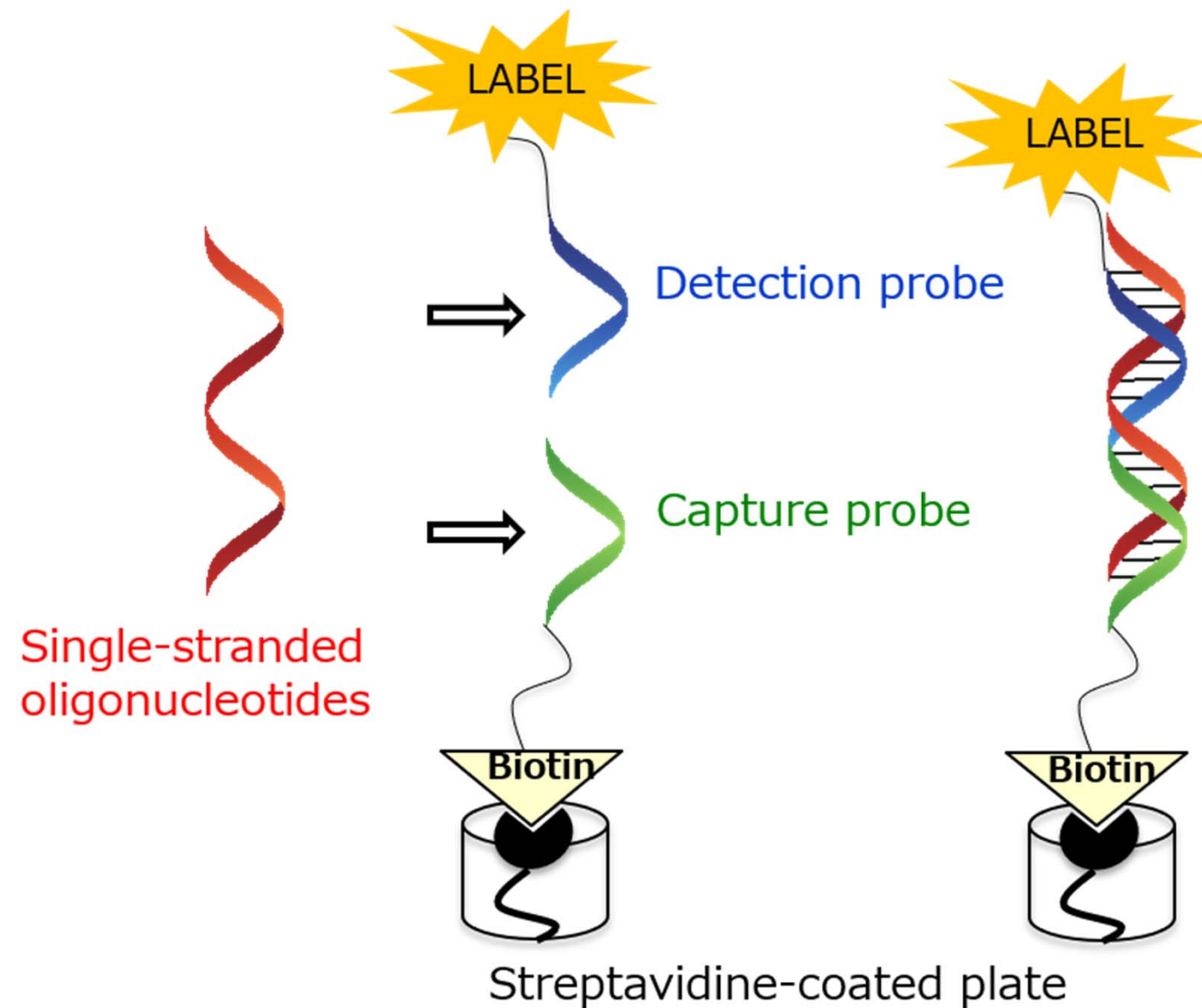
# LBAとの比較

---

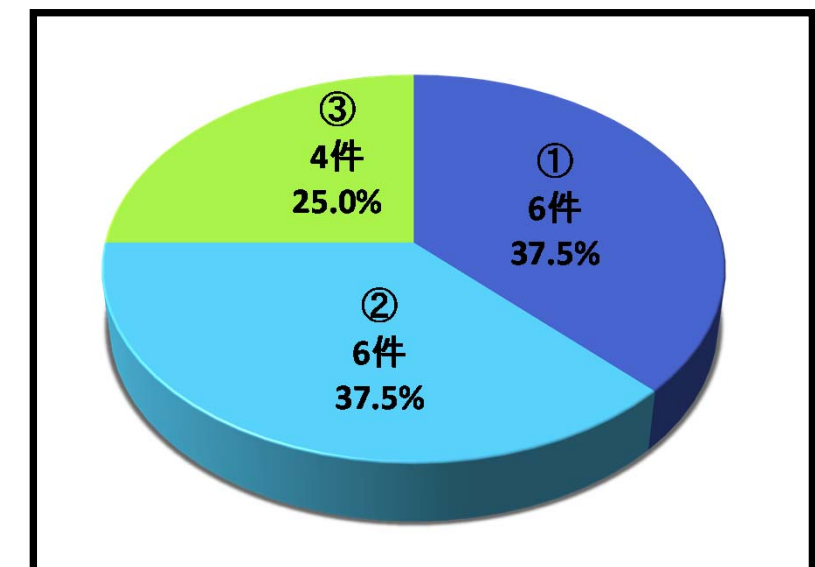
(Comparison with LBA)

## LBA概要

LBAにて核酸医薬品を測定する場合の一般的なスキーム



測定に用いる第一選択  
(アンケートQ23より)



①LC-MS法, ②LBA法,  
③qPCR, ④その他

Emfier, SM et al., (2005) *Oligonucleotides*, 15(2) 119-131



# LBAとの比較

## 比較項目

特異性・代謝物の評価

感度・ダイナミックレンジ

メソッド開発

スループット・頑健性

測定対象の特性

測定値の意味

# 特異性・代謝物の評価

- LC-MSはLBAに比べて、特異性が高い。
- 未変化体と代謝物の分別定量を含む、代謝物評価に有用。
- 核酸医薬品の代謝物として、以下のものが想定される。

## ①エキソヌクラーゼによる 末端塩基からの分解物

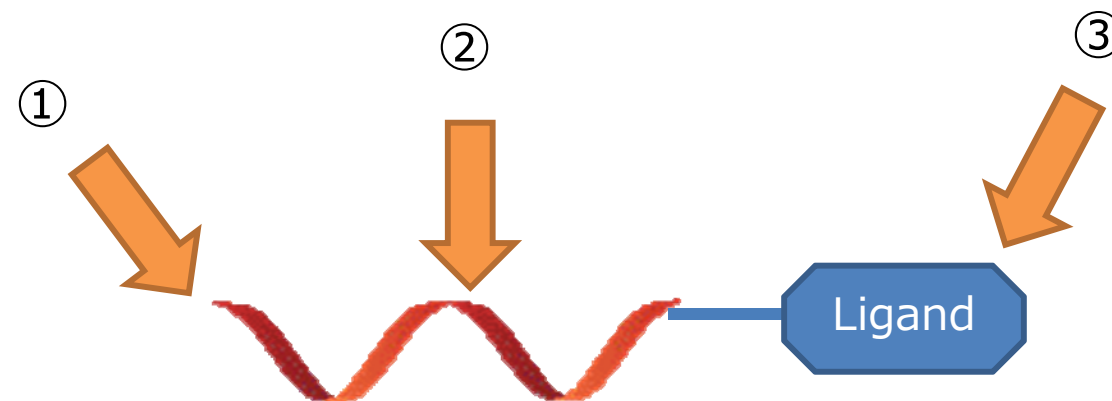
- 未変化体との分別検出可能
- ただし、感度・分子量次第

## ②エンドヌクラーゼによる 分解物

- 予測できない構造の分解物は検出困難

## ③DDSリガンドの欠失・代謝 (未知代謝物解析)

- LC-MSが唯一の検出手法
- 定量には標品必要



# 特異性・代謝物の評価

- 代謝物は低分子と同様，MISTガイダンスに沿って評価。

## 主要代謝物

- 標品を合成し，定量評価

## マイナーな代謝物/分解物

- 可能な範囲で評価
- 例 PS→PO体

## DDSリガンドの代謝

- 可能な範囲で評価

## 不純物

- 安全性評価はホワイトペーパー参照の上，各社判断  
(ガイドラインは未整備)

# 感度・ダイナミックレンジ

アンケート Q7,8,24,25より

- 感度：LC-MS < LBA/qPCR
- ダイナミックレンジ：LC-MS ≒ LBA/qPCR

LLOQ	LC-MS	LBA/qPCR	ダイナミックレンジ	LC-MS	LBA/qPCR
～ 0.1 ng/mL	0	4	～100倍	2	2
0.1 ～ 1 ng/mL	2	4	100～300倍	8	3
1 ～ 10 ng/mL	7	3	300～1000倍	7	3
10 ～ 100 ng/mL	5	1	1000倍～	1	4
100 ng/mL ～	1	0			

(単位：件)

<http://bioanalysisforum.jp/>

# メソッド開発

- LC-MSは一度メソッドを確立すれば、その後の修正が容易。

## LC-MSの場合

## LBAの場合

### 塩基配列の変更

- 即座に対応可能
- 複数配列の網羅的評価に重宝

- 対応に時間を要する
- プローブ再作成が必要

### マトリックスの変更 (血清→組織)

- 影響小さい
- バックグラウンドが上がる場合もあり

- 影響大きい
- バックグラウンドが上がる (組織中DNAの影響)

### DDSリガンド等の修飾の変更

- 大きな変更には条件検討必要
- 種々の条件検討が可能

- 適切なプローブ選択により、影響回避可能な場合もあり
- 変更できる条件はプローブのみ

### ステージ

- 配列や修飾の最適化まで
- スクリーニング評価向き

- 候補品が絞られた後
- 開発段階



# スループット・頑健性

- LC-MSはLBAに比べて、スループット・頑健性の面で劣る。
- 一方、メソッド立ち上げまでのコスト・時間の面では有利。

## LC-MSの場合

## LBAの場合

### ルーチン分析のスループット

- 1サンプル当たりの最低6分程度
- 前処理も含めて低スループット

- 1サンプル当たりの数秒
- 前処理はルーチン化可能
- Gyrolabの使用により自動化も可能

### 頑健性

- キャリーオーバー等、制御しきれない部分が残る
- 特殊な固相・カラム使用時には、ロット間差が影響
- 内標準補正によりばらつきを低減

- キットのロット間差や重要試薬が問題になる可能性もある
- Well間でのばらつきが大きく、特に日間再現性が難しい場合もある（天然型の場合）

### コスト・時間

- 安価（移動相や前処理に使用する一般的な試薬のみ）
- 調達にも時間を要しない

- 高価（特殊プレートや複数の酵素を使用）
- プローブ作成も時間と費用がかかる



# 測定対象の特性 (向き/不向き)

- LC-MSはLBAに比べて、特異性・汎用性が高く、複数成分の同時測定が可能。

## LC-MSの場合

## LBAの場合

### 塩基長

- 20mer程度以下
- 短いものほど有利

- 20-25mer以上で有用
- 短いと選択的かつ高親和性のプローブが作りにくい

### DDSリガンド結合体

- 結合体をそのまま検出可能

- プローブの設計により、DDSリガンドの影響を回避（リガンド有無の判別は不可）

### 2本鎖 (siRNAなど)

- 2本鎖のままの測定は困難であり、乖離して測定
- センス鎖も同時測定可能

- 乖離して測定
- センス鎖の測定には別途系立ち上げが必要
- ただし、2本鎖に対する抗体が取れば測定可能

# 測定値の意味

- LC-MSとLBAでは測定されるものは同じか？  
⇒検出原理が異なるため、測定値自体の持つ意味をよく考察する必要がある（未変化体/代謝物込み，総量/フリー体）。

## LC-MSの場合

## LBAの場合

### 検出しているもの

- 核酸医薬品そのものを直接的に検出

- 核酸医薬品の物量を，結合したラベルの強度に変換し間接的に検出

### タンパク結合の影響

- 前処理の過程で変性剤が用いられるため，タンパク質は不活性化される．総濃度（結合形濃度＋非結合形濃度）として測定

- タンパク変性を伴わない前処理の場合，非特異的吸着したものは測定されないため，非結合形濃度として測定
- Proteinase K処理や界面活性剤，熱処理などを加える前処理の場合，タンパク質は不活性化される．総濃度として測定

- LC-MS・LBAどちらの手法を使うべきか？  
⇒ガイドラインの項目を満たせば，創薬～開発段階で利用可能であり，目的に応じて使い分けが可能。  
⇒ LC-MSは感度・頑健性の点で劣るものの，開発段階では特異性を活かして代謝物分析等に，創薬段階では塩基配列に依存しないことから，メソッドの汎用性を活かしたスクリーニング評価に適用可能。

	LC-MS	LBA
特異性	○	×
感度	×	○
ダイナミックレンジ	同程度	同程度
メソッドの汎用性	○	△
ステージ	創薬	開発
スループット	×	○
頑健性	×	○
塩基長	25mer以下	20mer以上